

=> d his full

(FILE 'HOME' ENTERED AT 09:10:41 ON 27 MAR 2000)

FILE 'CAPLUS' ENTERED AT 09:10:52 ON 27 MAR 2000

L1 196679 SEA (SENSOR OR DETECTOR OR (TEST (1A) STRIP))
L2 447685 SEA L1 OR ELECTRODE
L3 10695 SEA L2 AND (OXIDASE OR ENZYME OR REDUCTOXIDASE)
L4 10695 SEA L2 AND (OXIDASE OR ENZYME)
L5 2031 SEA L4 AND BLOOD
L6 30 SEA L5 AND SILICA

FILE 'STNGUIDE' ENTERED AT 09:13:50 ON 27 MAR 2000

FILE 'CAPLUS' ENTERED AT 09:15:06 ON 27 MAR 2000

D 10
D 5
D 5-30 ALL

FILE 'STNGUIDE' ENTERED AT 09:24:20 ON 27 MAR 2000

L7 0 SEA L5 AND SILIC?

FILE 'CAPLUS' ENTERED AT 09:24:45 ON 27 MAR 2000

L8 84 SEA L5 AND SILIC?
L9 54 SEA L8 NOT L6
D 10
D 11-30 ALL
D 31-40 ALL
L10 1630 SEA (SILICA AND BLOOD)/AB
L11 52 SEA L10 AND (RED (1A) BLOOD)
D 20
D 21-30
D 31-40
L12 11391 SEA L2 AND BLOOD
L13 425 SEA L12 AND (SILICA OR SILICATE)
L14 8 SEA L13 AND ((RED (1A) BLOOD) OR HEMOGLOBIN)
D 1-8 ALL

FILE 'STNGUIDE' ENTERED AT 09:40:24 ON 27 MAR 2000

L15 0 SEA L13 AND BLOOD

FILE 'CAPLUS' ENTERED AT 09:41:56 ON 27 MAR 2000

L16 425 SEA L13 AND BLOOD
L17 0 SEA L16 AND CAB!O!SIL
L18 0 SEA L16 AND O!SIL
L19 0 SEA CAB!O!SIL
L20 922 SEA (CAB(1A) O (1A)SIL)
L21 1 SEA L16 AND L20
D
D ALL
L22 11 SEA L2 AND L20
D 1-11 ALL

FILE 'STNGUIDE' ENTERED AT 09:46:27 ON 27 MAR 2000

FILE HOME

289135

Jacob, Rebecca (GCI)

From: STIC-ILL
Sent: Monday, March 27, 2000 10:40 AM
To: Jacob, Rebecca (GCI)
Subject: FW: publications request

-----Original Message-----

From: Mellerson, Kendra
Sent: Monday, March 27, 2000 10:33 AM
To: STIC-ILL
Subject: FW: publications request

-----Original Message-----

From: Noguerola, Alex
Sent: Monday, March 27, 2000 9:53 AM
To: STIC-EIC1700
Subject: publications request

Please order the article listed below.

Thank you.

COMPLETED

Art Unit or Location <1743>

Telephone Number <305-5686 >

Application Number or Other Order Identifier <09/228,855 >

Request 1

Author < Yao et al. >

Journal < Bunseki Kagaku >

Pages if a Journal < 927-32 >

Volume And Issue if a Journal < 44(11) >

Year Of Publication <1995 >

BUNSEKI KAGAKU Vol. 44, No. 11, pp. 927-932 (1995)

Reprinted with permission by the Publisher. This material is protected by copyright and cannot be further reproduced or stored electronically without publisher permission and payment of a royalty fee for each copy made. All rights reserved.

報 文

ゾル-ゲル法により作製した酵素含有シリカゲル薄膜 被覆グルコースセンサー

八尾 俊男^{*,**}, 原田 郁子^{*}, 中原 武利^{*,**}

(1995年6月19日受付)

(1995年7月14日審査終了)

酵素を含有したシリカゲル薄膜を被覆したグルコースセンサーをゾル-ゲル法により作製し、得られたセンサーの特性を評価した。センサーはオルトケイ酸メチル (TMOS) 50 μ l と 1.5 mg のグルコース酸化酵素 (GOD) を含むリン酸緩衝液 (10 mM, pH 5.5) 100 μ l のゾル溶液に、白金ディスク電極の先端部を浸して引き上げた後、2日間空气中で乾燥させて作製した。得られたセンサーは 0.6 V (vs. Ag/AgCl) の印加電圧でグルコースに迅速に反応したが (応答時間: 15 秒)、アスコルビン酸により妨害を受けた。そこで、センサーの選択性を改善するために、TMOS と GOD とペルオキシダーゼの混合ゲル溶液から、上記と同様の方法でセンサーを作製した。このセンサーは、メディエーター物質としてヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウムやフェロセンカルボン酸を用いると、0 V の電位でグルコースに迅速に反応し、10–2000 μ M の範囲において直線性の良好な検量線が得られた。又、0.2 mM 以下のアスコルビン酸はグルコースの測定に妨害とならなかった。

1 緒 言

ゾル-ゲル法はガラスやセラミックスの低温合成法として、新しい無機材料の合成に利用されている。更に、無機材料だけでなく無機物質と有機物質の特徴を兼ね備えた新材料の合成にも利用され、例えばローダミン 6G 塩化物¹⁾やルテニウム錯体²⁾など、色素レーザー作用や蛍光特性を有する機能性有機分子がシリカゲル中に導入された。又、プロモフェノールブルー³⁾や1-ニトロソ-2-ナフトール⁴⁾などの分析試薬を包括した多孔性ゾル-ゲルガラスが、化学センシング材料として利用されている。

近年、ゾル-ゲル法で作製したシリカゲル中に生体分子を、その親和性や活性を保持したまま包括できることが示され^{5)–8)}、ゾル-ゲル法を新しいバイオセンサー開発のための手段とする道が開かれた。Braun らは、オルトケイ酸メチル (TMOS) から作製したキセロゲルにグルコースオキシダーゼ (GOD) とペルオキシダーゼ (POD) と色素を包括し、ゲルの透明性を利用したオプティカルバイオセンサーを開発した⁹⁾。Yamanaka らは、GOD を包括したゾル-ゲルモノリスを細粒に粉砕

したものをグルコースの吸光度定量に応用した¹⁰⁾。又、Tatsu らは、GOD を包括したオルトケイ酸エチルのゾル-ゲルモノリスを、グルコースのフローセンサーに利用した¹¹⁾。Narang らは、2枚のシリカゲル層間に GOD をサンドイッチした構造の電流測定型グルコースセンサーを開発した¹²⁾。又、その他の研究が Dave らの総説¹³⁾の中にも引用されている。しかし、シリカゲル薄膜に酵素分子を包括した電流測定型バイオセンサーは現在のところまだ報告されていない。

本研究では、酵素を含んだゾル溶液からディップコーティング法で酵素を包括したシリカゲル薄膜を白金電極上に形成させて、グルコースに反応する酵素センサーを作製する方法について検討した。その場合、酵素の活性を保持したまま包括するために、アルコールを使用しない方法でシリカゲル薄膜を作製することを試みた。この方法は、シリコンアルコキシドの加水分解生成物としてアルコールが生成することを考慮すると、出発溶液にアルコールを加えなくても反応過程で溶液の均質化が起こることの考えに基づいている¹⁴⁾。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

GOD (18.5 U mg⁻¹, Aspergillus niger 起源) は Sig-

* 大阪府立大学工学部: 593 大阪府堺市学園町 1-1

** 大阪府立大学先端科学研究所: 593 大阪府堺市学園町 1-2

ma 製のものを、POD (251 U mg^{-1} , 西洋ワサビ起源) は和光純薬工業製 EIA 用のものを使用した。n-グルコースと過酸化水素は和光純薬工業製のものを、TMOS は東京化成工業製のものを使用した。その他の試薬は、市販の特級品をそのまま使用した。

測定には参照電極として銀/塩化銀電極を用い、ポテンシオスタット、電解セル及びその他の器具は既報¹⁵⁾と同じものを用いた。FIA 測定には、サスキ工業製 DMX-2000 型送液ポンプと $100 \mu\text{l}$ のサンプルループを備えた Rheodyne 製 7125 型サンプルインジェクター及び新王子製紙製 BF-2 型電極を下地電極とするフロー型グルコース酵素電極とから構成されたものを用いた。インジェクターと酵素電極の接続には、長さ 1.5 m のテフロン管 (内径 0.5 mm , 外径 1.5 mm) を用いた。

2.2 グルコースセンサーの作製

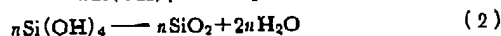
GOD 1.5 mg を溶解した 10 mM ($1 \text{ M} = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) リン酸緩衝液 (pH 5.5) $100 \mu\text{l}$ に、TMOS $50 \mu\text{l}$ を加え、1 分間激しくかき混ぜる。白金ディスク電極 ($3 \text{ mm}\phi$; フロー型センサーでは $2 \text{ mm}\phi$) を、上記の GOD-TMOS 溶液に 30 秒浸して、ゆっくりと引き上げる。これを室温で 2 日間乾燥させ、GOD を包括したシリカゲル薄膜を電極表面に形成させた。更に、電極表面を透析膜 (排除限界: 50000) で被覆して実験に使用した。

又、GOD 0.9 mg と POD 0.6 mg を含むリン酸緩衝液から、上記の方法と同様の方法で、GOD と POD の包括シリカゲル薄膜を被覆したグルコースセンサーを作製した。

3 結果と考察

3.1 GOD 包括シリカゲル薄膜被覆グルコースセンサー

ゾル-ゲル法でシリカゲル薄膜を作製する場合、アルコキシドの加水分解反応 [式 (1)] と縮合反応 [式 (2)]



が連続的に起こり、酸化水素粒子が生成して溶液はゾルとなり、更に反応が進むと全体が固まったゲルとなる。このような反応により GOD を包括したゲル薄膜を被覆したセンサーを作製する方法について検討し、得られたセンサーの特性を評価した。

3.1.1 電極作製方法の最適化 Braun らの方法⁶⁾に従って調製したゾル溶液から、GOD を包括したゲル薄膜を電極面に形成させることを試みたが、乾燥時にクラックが生じ、均一な膜が形成されなかった。そこで、酵素を包括したクラックのない均一な膜を形成させるために、ゾル溶液の組成など電極作製方法について検討した。まず、酵素溶液を調製する緩衝液 [10 mM リン酸緩衝液 (PBS)] の pH について検討した。Braun らは、酵素を効率よくバルクゲルに包括するためには、ゾル溶液の pH は酵素の等電点以上であることが望ましいと報告している。GOD の等電点は 4.2 であるので、pH 5.5 と 7.0 の 2 点で検討を行った。GOD を添加せずに PBS と TMOS を混合した溶液からゲル膜を電極面に形成させた場合、pH 7.0 では TMOS : PBS = $1 : 2$, $1 : 5$ (v/v) でクラックを生じたが、 $1 : 10$ でクラックのない均一な膜を形成させることができた。

一方、pH 5.5 では TMOS : PBS = $1 : 2$ でもクラックのない膜を作製できた。そこで、GOD を最終濃度で 10 mg ml^{-1} になるように溶解し、TMOS : PBS = $1 : 10$ の混合溶液でゲル膜を形成させたところ、pH 7.0 で調製した場合には 1 mM グルコースに対して 42 nA の応答電流しか得られなかったが、pH 5.5 では約 1150 nA の応答電流が得られた。又、pH 7.0 ではゲル溶液の粘性が短時間に増加するので、コーティング操作が困難であった。そこで、PBS の pH を 5.5 とし、TMOS : PBS の混合比率について検討した。TMOS : PBS (v/v) = $1 : 2$, $1 : 5$, $1 : 10$ のゾル溶液 (それぞれ 10 mg ml^{-1} の GOD を含む) で、それぞれ 3 本の電極についてコーティング操作を行った。TMOS : PBS = $1 : 10$ の場合には電極間の再現性は非常に悪かった。一方、 $1 : 5$, $1 : 2$ の組成比で作製した電極では、それぞれ 3 本の電極はグルコースに対してほぼ同程度の応答を示したが、 $1 : 2$ の組成比で作製した電極は $1 : 5$ で作製した電極に比べて、グルコースに対する応答感度は約 2.3 倍であった。又、膜の乾燥時間について検討した結果、乾燥時間が 24 時間以内ではグルコースに対する応答電流が測定ごとに減少した。これはゲル化が不完全であるために GOD がゲル膜から流出するためであると考えられる。乾燥時間を 2 日間にするとかかなり安定な応答が得られ、10 回の測定 (0.1 mM グルコース) に対する応答電流の相対標準偏差は 2.2% であった。以上の検討の結果、最適な酵素センサーの作製方法として 2.2 項で示した方法を用いることにした。

3.1.2 測定基礎液の pH グルコースに対する応答電流への測定基礎液 (0.1 M リン酸緩衝液) の pH の

Table 1 Analytical result of calibration graph for glucose

Type of sensor	Calibration graph		<i>r</i>
	Linear range/ mM	Regression line†	
Batch	$2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-3}$	$y = 1112x + 2.0$	0.999
Flow	$5 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-2}$	$y = 48.6x + 6.6$	0.997

† Unit: $x = \text{mM}$, $y = \text{nA}$. r : linear correlation coefficient. Flow rate = 0.7 ml min^{-1} , injection volume = $10 \mu\text{l}$

影響について検討した。最大の応答電流が pH 6.5~7 で得られ、包括された GOD の至適 pH が溶液酵素 (至適 pH=5.6) よりもアルカリ側にシフトした。この至適 pH のアルカリ側へのシフトはシリカセロゲル中に包括されたトリブシンにおいても認められている¹⁶⁾¹⁷⁾。これはシリカが酸性酸化物 (等電点 $\text{pI}=2$) であり¹⁸⁾、pH 2.5 以上では負に帯電しているため、シリカゲル中に水素イオンが集まり、酵素活性を決定する内部の pH がバルク溶液の pH よりも低くなっているからと考えられる。そこで、以後の実験では測定基礎液に pH 6.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を用いることにした。

3.1.3 検量線 GOD 包括シリカゲル薄膜被覆したグルコースセンサーを、バッチ測定方式と FIA 方式で用いた場合のグルコースに対する検量線の解析結果を Table 1 に示す。FIA 方式では、バッチ測定方式センサーで最適化された pH 6.5 の 0.1 M リン酸緩衝液をキャリアー溶液とし、 0.7 ml min^{-1} の一定流量で送液した。なお、得られた検量線は試料量 $10 \mu\text{l}$ に対するものである。その結果、FIA 方式では、試料ゾーンのキャリアー溶液への分散により、検量線の感度が低くなったが、直線範囲が高濃度側にシフトしたのでより高濃度のグルコースの測定が可能であった。又、バッチ測定方式のセンサーの応答時間は約 15 秒であり、FIA 方式では 1 分間に 30 試料の連続定量が可能であった。Fig. 1 は Eadie-Hofstee の式¹⁹⁾に従って応答電流と (応答電流/濃度) との関係を示したものである。この直線の解析結果から、 I_{max} (最大応答電流) は $10.3 \mu\text{A}$ 、 K_m^{app} (見かけの Michaelis-Menten 定数) は 1.51 mM と算出された。

3.2 GOD-POD 同時包括シリカゲル薄膜被覆グルコースセンサー

3.1 で示した GOD 包括シリカゲル薄膜被覆グルコー

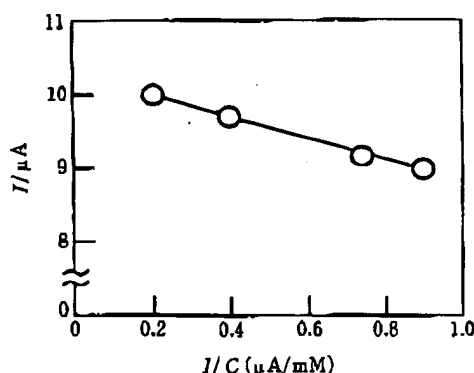
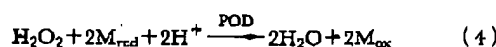
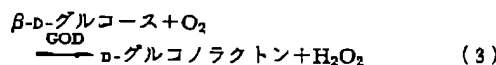


Fig. 1 Eadie-Hofstee plots of a sol-gel silicate-based glucose sensor

Eadie-Hofstee plot: $I = I_{\text{max}} - K_m^{\text{app}}(I/C)$

スセンサーでは、印加電圧が 0.6 V (vs. Ag/AgCl) と高く、アスコルビン酸などの被酸化性物質が電極で直接酸化を受けるので妨害となった。そこで、低電位でグルコースを検出することを目的とし、シリカゲル中に GOD と POD を同時に包括したセンサーを、2.2 項で示した方法により作製した。この電極では、GOD の酵素触媒反応 [式(3)] によって生成した過酸化水素が、更に POD による酵素触媒反応で還元型メディエーター (M_{red}) と反応する [式(4)]。



生じた酸化型メディエーター (M_{ox}) が電極上で還元される際の電流 [式(5)] を検出することで、グルコースに対する応答が得られる。メディエーターとして、ヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウムとフェロセンカルボン酸を測定溶液に加え、グルコースに対する応答を比較した。又、両メディエーターは共に、 0 V (vs. Ag/AgCl) の印加電圧で検出できる。

メディエーターとして 2 mM のヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウムを用い、応答電流に及ぼす測定基礎液の pH の影響について検討した結果、グルコースと過酸化水素に対する応答電流は pH 5~7.5 の範囲でほとんど pH に依存しなかった。そこで、先に述べた GOD 包括グ

Table 2 Analytical result of calibration graphs for glucose and hydrogen peroxide by use of two different mediators

Mediator	Substrate	Linear range/ mM	Calibration graph	
			Regression line [†]	r
2 mM	Glucose	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-3}$	$y = 215x + 3.6$	0.999
Hexacyanoferrate(II)	Hydrogen peroxide	$9 \times 10^{-8} - 4 \times 10^{-5}$	$y = 15.8 \times 10^3 x + 1.4$	0.999
0.2 mM	Glucose	$5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-3}$	$y = 257x + 1.5$	0.999
Ferrocenecarbonate	Hydrogen peroxide	$9 \times 10^{-8} - 9 \times 10^{-6}$	$y = 18.2 \times 10^3 x + 3.7$	0.997

[†] Unit: $x = \text{mM}$, $y = \text{nA}$. r : linear correlation coefficient

Table 3 Analytical results for the assay of glucose in human control sera

Sample	Indicated value/ mg dl^{-1}	Analytical value ($\text{mg/dl} \pm \text{S.D.}$)	
		Batch	Flow
Standard solution	80.0	78.3 ± 1.6	79.5 ± 0.8
Wako I	79 ± 10	80.2 ± 1.5	79.8 ± 0.7
Wako II	255 ± 14	249.6 ± 5.1	252.8 ± 2.5
Ortho normal	93 ± 7	90.8 ± 1.5	91.6 ± 1.2
Ortho abnormal	296 ± 23	300.2 ± 5.7	298.2 ± 3.0

ルコースセンサーの場合と同じ pH 6.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を測定基礎液として用いた。なお、メディエーター濃度はヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウムで 2 mM、フェロセンカルボン酸の場合は水にやや難溶であることから 0.2 mM とした。

両メディエーターを用いた場合のグルコースと過酸化水素に対する検量線の解析結果を Table 2 に示す。過酸化水素に対するセンサーの感度はグルコースに対するその約 70 倍であり、検出下限は 5×10^{-6} M と比較的高感度であったが、検量線の直線範囲はかなり低濃度に限定された。又、グルコースに対する応答電流は先に述べた GOD 包括シリカゲル薄膜被覆センサーのそれに比べて 20~25% であった。しかし、メディエーターの違いによるセンサー応答の差異はあまり認められなかった。Fig. 2 に両メディエーターを用いた場合の実際の応答を示す。過酸化水素に対する応答（応答時間：2~3 秒）に比べグルコースの応答は遅いが、それでも応答時間は 20~30 秒であった。この応答時間の差異は、グルコースと過酸化水素のシリカゲル膜中の拡散速度の違いと、包括された GOD と POD の比活性の違いによるものと考えられる。

GOD-POD 同時包括シリカゲル薄膜被覆センサーをフロー型センサーとして FIA 流路に組み込み、キャリ

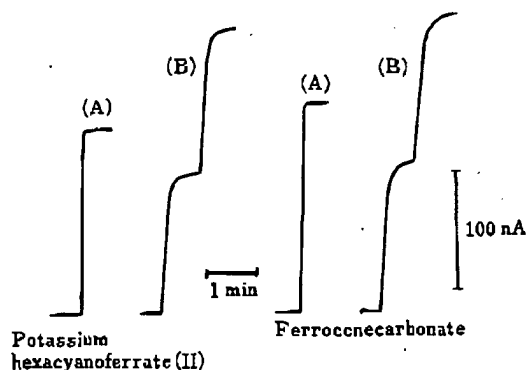


Fig. 2 Typical responses for $9 \mu\text{M}$ H_2O_2 (A) and 0.5 mM glucose (B) obtained by using potassium hexacyanoferrate(II) and ferrocenecarbonate as a mediator

ヤー溶液として 2 mM ヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を用いて、グルコースと過酸化水素に対する検量線を作成した。検量線の直線範囲はグルコースに対して $5 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-2}$ M [帰式: $y(\text{nA}) = 65.5x(\text{mM}) + 1.65$]、過酸化水素に対して $1.8 \times 10^{-5} \sim 9 \times 10^{-4}$ M [帰式: $y(\text{nA}) = 738x$]

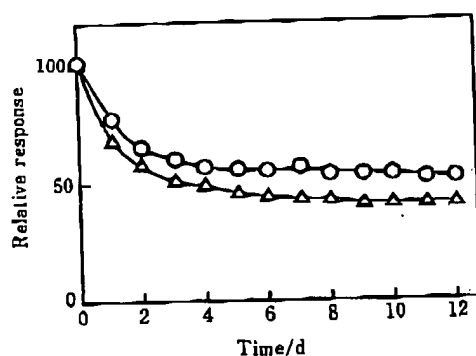


Fig. 3 Long term stability of batch type (○) and flow type (△) sensors toward 0.1 mM glucose

(mM)+5.39] であり、直線の相関係数はいずれも 0.999 であった。

GOD-POD 同時包括シリカゲル薄膜被覆センサーをバッチ測定型センサー及びフロー測定型センサーとして用い、4 種の管理血清中のグルコースの定量に応用した。

Table 3 に定量結果を示す。定量値は表示値とよく一致し、測定の再現性 (相対標準偏差) もバッチ測定型センサーで約 2%, フロー測定型センサーで約 1% であった。又、このセンサーは 0 V でグルコースを検出でき、0.2 mM 以下のアスコルビン酸や尿酸などの被酸化性物質による妨害を受けなかった。Fig. 3 にバッチ測定及びフロー測定に用いたグルコースセンサーの安定性を示す。2 週間にわたって毎日 10 試料 (0.1 M グルコース) の測定を行い、センサー作製時の応答電流を 100 とした場合の相対応答を示した。センサー応答は 2 日後までに初期応答の 60~65% に減少し、経時的な感度の減少を伴うが、約 2 週間にわたって使用できた。これは包括された酵素がゲルマトリックスから溶出するためと考えられるので、現在センサーの安定性の改善などについて固定化方法を合わせて検討中である。

シリカゲル薄膜を酵素固定化用担体として用いたグルコースセンサーは、得られる応答が迅速で、検量線の直線範囲も比較的広く、作製が容易であるなどの利点を示し、使い捨てセンサーとしての応用が考えられる。そこで、GOD 以外の他のオキシダーゼ酵素をシリカゲル薄膜中に包括固定することで、各種の酵素センサーを作製することを試みた。酵素として、キサンチン酸化酵素と乳酸酸化酵素を選び、ヒポキサンチンと L-乳酸に反応するセンサーをグルコースセンサーの場合と同様の方法

で作製した。しかし、いずれの場合も対応する基質に対してほとんど応答しなかった。この原因として、シリコンアルコキシドの加水分解によって生成したアルコールや残存している TMOS、あるいは酸性 pH 条件 (pH=5.5) による酵素の変性が考えられる。又、加水分解時に TMOS が酵素に反応性を示したり、シリカゲル膜中のメトキシ残基やヒドロキシル残基との相互作用により酵素の活性中心近傍の立体構造が変化する²⁰⁾ ことなども原因として考えられるが、現在のところ詳細を明らかにしていない。いずれにしても、この方法を他のセンサーに応用するためには、酵素個々について最適な固定化条件を詳細に検討する必要がある。

最後に、本研究の一部は文部省科学研究費補助金の助成により実施されたことを付記し謝意を表します。

(1994 年 10 月, 日本分析化学会)
第 43 年会において一部発表

文 献

- 1) U. Narang, R. Wang, P. N. Prasad, F. V. Bright: *J. Phys. Chem.*, **98**, 17 (1994).
- 2) B. D. MacCraith, C. M. McDonagh, G. O'Keefe, E. T. Keyes, J. G. Vos, B. O'Kelly, J. F. McGilp: *Analyst (London)*, **118**, 385 (1993).
- 3) J. E. Lee, S. S. Saavedra: *Anal. Chim. Acta*, **285**, 265 (1994).
- 4) R. Zusman, C. Rotman, M. Ottolenghi, D. Avnir: *J. Non-Cryst. Solids*, **122**, 107 (1990).
- 5) B. Iosefzon-Kuyavskaya, I. Gigozin, M. Ottolenghi, D. Avnir, O. Lev: *J. Non-Cryst. Solids*, **147&148**, 808 (1992).
- 6) S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi: *Mater. Lett.*, **10**, 1 (1990).
- 7) I. M. Ellerby, C. R. Nishida, F. Nishida, S. A. Yamanaka, B. Nunn, J. S. Valentine, J. I. Zink: *Science (Washington, D. C.)*, **255**, 1113 (1992).
- 8) R. Wang, U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright: *Anal. Chem.*, **65**, 2671 (1993).
- 9) S. Braun, S. Shtelzer, S. Rappoport, D. Avnir, M. Ottolenghi: *J. Non-Cryst. Solids*, **147&148**, 739 (1992).
- 10) S. A. Yamanaka, F. Nishida, I. M. Ellerby, C. R. Nishida, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink: *Chem. Mater.*, **4**, 495 (1992).
- 11) Y. Tatsu, K. Yamashita, S. Yamamura, H. Yamamoto, S. Yoshikawa: *Chem. Lett.*, **1992**, 1615.
- 12) U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright, K. Ramamathan, K. D. Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasnan, S. Chandra: *Anal. Chem.*, **66**, 3139 (1994).
- 13) B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink: *Anal. Chem.*, **66**, 1120A (1994).
- 14) D. Avnir, V. R. Kaufman: *J. Non-Cryst. Solids*, **92**,

- 180 (1987).
- 15) 八尾俊男, 和田瑞穂, 和佐 保: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 397 (1993).
- 16) P. Johnson, T. L. Wharley: *J. Colloid Interface Sci.*, **37**, 557 (1971).
- 17) P. Johnson, T. L. Wharley: *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 323 (1972).
- 18) L. I. Hench, J. K. West: *Chem. Rev.*, **90**, 33 (1990).
- 19) R. A. Kamin, G. S. Wilson: *Anal. Chem.*, **52**, 1198 (1980).
- 20) G. Carturan, R. Camposini, S. Pire, V. Scardi, E. De Alleviis: *J. Mol. Cat.*, **57**, L-13 (1989).



Glucose sensor with an enzyme-entrapped silica gel film prepared by a sol-gel method. Toshio YAO^{*,**}, Ikuko HARADA^{*} and Taketoshi NAKAHARA^{*,**} (* Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture, 1-1, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 593; ** Research Institute for Advanced Science and Technology, University of Osaka Prefecture, 1-2, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 593)

A sol-gel silicate-based biosensor for glucose was made up by dip coating the end surface of a platinum-disk electrode in a sol solution comprising 50 μ l of tetramethyl orthosilicate (TMOS) and 100 μ l of 10 mM phosphate buffer (pH 5.5) containing 1.5 mg glucose oxidase (GOD), followed by drying for two days under ambient conditions. Although the prepared sensor responded rapidly (ca. 15 s) at 0.6 V (vs. Ag/AgCl), the presence of an electroactive species, such as ascorbate, interfered with the measurement of glucose. Subsequently, another sol-gel biosensor was constructed from a gel solution comprising TMOS, GOD, and peroxidase by a similar sol-gel procedure, to improve the selectivity of the sensor. This sensor responded rapidly (ca. 20~30 s) to glucose at 0 V in the presence of a mediator, such as hexacyanoferrate(II) or ferrocenecarbonate, without any interference from ascorbate below 0.2 mM. A plot of the current response vs. the glucose concentration gave a straight line over the 1×10^{-5} ~ 2×10^{-3} M range. In addition, this sensor was well suited as a detector of a flow-injection system. Reliable results were obtained in the assays of glucose in controlled human sera.

(Received June 19, 1995)

(Accepted July 14, 1995)

Keywords

sol-gel entrapped enzyme; glucose biosensor; tetramethyl orthosilicate; glucose oxidase; peroxidase.